

INTENZIVNÍ MEDICÍNA

PŮVODNÍ PRÁCE

Plazmafiltrace spojená s adsorpcí v experimentálním septickém šoku – překlad originálního článku*

Sýkora Roman^{1,2}, Chvojka Jiří^{1,2}, Kroužecký Aleš^{1,2}, Raděj Jaroslav^{1,2}, Kuncová Jitka³, Varnerová Veronika², Karvunidis Thomas^{1,2}, Novák Ivan^{1,2}, Matějovič Martin^{1,2}

¹Jednotka intenzivní péče, I. interní klinika, Fakultní nemocnice Plzeň

²Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze

³Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze

Souhrn

Cíl studie: Plazmafiltrace spojená s adsorpcí (CPFA) je hemoeliminační metoda založená na adsorpci a vyvinutá k neselektivnímu odstraňování mediátorů sepse. Cílem studie je zhodnotit účinnost této hemopurifikační metody v průběhu septického šoku na celkovou a regionální hemodynamiku, mikrocirkulaci, energetický metabolismus, oxidativní/nitrosativní stres, endoteliální a koagulační dysfunkci.

Typ studie: Kontrolovaná randomizovaná experimentální studie.

Materiál a metody: U 16 selat jsme v celkové anestezii a na umělé plicní ventilaci indukovali peritonitidu, která postupně za tekutinové resuscitace progredovala do hyperdynamického septického šoku. Noradrenalin jsme použili v případě, že objemová resuscitace nestačila k udržení MAP nad 65 mm Hg. Po 12 hodinách peritonitidy jsme zvířata rozdělili do dvou skupin – pouze s podpůrnou léčbou (Control, n = 8), nebo byla navíc napojena na CPFA (CPFA, n = 8).

Výsledky: Před zahájením peritonitidy, ve 12., 18. a 22. hodině jsme měřili systémovou hemodynamiku, regionální hemodynamiku hepatosplanchniku a ledvin, systémový a regionální metabolismus kyslíku a energetický metabolismus (laktát/pyruvát, poměr ketolátů v jaterní žilní krvi), mikrocirkulaci sliznice ilea a kůry ledviny, markery zánětu (TNF- α , IL-6), parametry nitrosativního/oxidativního stresu (reaktanty s kyselinou thiobarbiturovou, nitráty+nitrity), endoteliální a koagulační dysfunkci (asymetrický dimethylarginin, von Willebrandův faktor, komplexy trombin-antitrombinu a počet trombocytů). Léčba CPFA neoddálila rozvoj hypotenze, ani neovlivnila použitou dávku noradrenalinu. Léčba CPFA neovlivnila sepsí způsobené poškození mikrocirkulace, markery buněčné energetiky, endoteliálního poškození a systémového zánětu. Plicní a jaterní dysfunkce nebyly léčbou CPFA ovlivněny, a dokonce došlo ke zhoršení sepsí indukovaných poruch koagulace a oxidativního/nitrosativního stresu.

Závěry: V experimentálním modelu septického šoku selete nevedlo časně zahájení léčby CPFA k ovlivnění sepsí vyvolaných poruch orgánových funkcí ani ostatních biologických systémů podílejících se na patogenezí sepse. Efektivitu i účinnost CPFA je potřeba vyhodnotit v dalších klinicky relevantních experimentech.

Klíčová slova: seps, septický šok – experimentální model – plazmafiltrace spojená s adsorpcí – mikrocirkulace – energetický metabolismus – oxidativní stres – nitrosativní stres – koagulační porucha – endoteliální dysfunkce

Abstract

Coupled plasma filtration adsorption in experimental septic shock

Objective: Coupled plasma filtration adsorption (CPFA) was developed as an adsorptive hemopurification method aimed at nonselective removal of circulating soluble mediators potentially involved in the pathogenesis of sepsis. We hypothesized that this nonselective hemopurification could protect from detrimental consequences of long-term, volume-resuscitated porcine septic shock.

Design and setting: Randomized, controlled experimental study.

Materials and methods: In sixteen anesthetized and mechanically ventilated piglets hyperdynamic septic shock secondary to peritonitis was induced by intraperitoneal inoculation with faeces. The piglets were treated with fluid resuscitation and norepinephrine infusion as needed to maintain mean arterial pressure above 65 mm Hg for 22 hours. After 12 hours of peritonitis the animals were randomized to receive either supportive treatment (Control, n = 8) or CPFA treatment (CPFA, n = 8).

Results: Systemic, hepatosplanchnic and renal hemodynamics, oxygen exchange, energy metabolism (lactate/pyruvate and ketone body ratios), ileal mucosal and renal cortex microcirculation, systemic inflammation

* Studie byla publikována v originálním znění: **Coupled plasma filtration adsorption in experimental peritonitis-induced septic shock.** *Shock*, 2009 May; 31(5):473–480.

Studie byla oceněna cenou Poster Award na 28th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine v Bruselu 18.–21. března 2008 a cenou za nejlepší poster na II. kongresu ČSARIM, Plzeň 2008.

Roman Sýkora a Jiří Chvojka přispěli ke studii stejnou měrou.

Studie byla provedena v experimentální laboratoři centrálního zvěřince Lékařské fakulty v Plzni.

(TNF- α , IL-6), nitrosative/oxidative stress (thiobarbituric acid reactive species, nitrates+nitrites), endothelial/coagulation dysfunction (asymmetric dimethylarginine, von Willebrand factor, thrombin-antithrombin complexes, platelet count) were assessed before and at 12, 18, and 22 hours of peritonitis. CPFA did not delay the development of hypotension nor reduced the dose of norepinephrine. The treatment failed to attenuate sepsis-induced alterations in microcirculation, surrogate markers of cellular energetics, endothelial injury and systemic inflammation. Similarly, CPFA did not protect from lung and liver dysfunction or aggravated sepsis-induced disturbances in coagulation and oxidative/nitrosative stress.

Conclusions: In this porcine model of septic shock, early treatment with CPFA was incapable of reversing sepsis-induced disturbances in various biological pathways and organ systems. Both the efficacy and safety of this method require further rigorous experimental validation in clinically relevant models.

Keywords: sepsis – septic shock – experimental model – coupled plasma filtration adsorption – microcirculation – energy metabolism – oxidative stress – nitrosative stress – coagulation – endothelial dysfunction

Anest. intenziv. Med., 21, 2010, č. 2, s. 95–103

Úvod

Použití mimotělních hemoelimačních metod jako podpůrné terapie v léčbě sepse je v poslední době velmi diskutovaným a dosud neuzavřeným tématem [1–3]. Nedávno byla vyvinuta eliminační metoda, plazmafiltrace spojená s adsorpcí (CPFA, coupled plasma filtration adsorption). Jedná se o adsorpční metodu hemopurifikace zaměřenou na neselektivní odstraňování cirkulujících solubilních mediátorů, které se podílejí na patogenezi sepse a septického šoku [4–7]. Tato metoda se skládá z plazmafiltru, adsorpční kapsle obsahující syntetickou makroporézní pryskyřici s vysokou adsorpční kapacitou a ze standardního hemofiltru [4]. K neselektivnímu odstraňování zánětlivých mediátorů dochází na hydrofobní makroporézní styrenové pryskyřici, která efektivně adsorbuje četné cytokiny a mediátory [8, 9], což podporují *in vitro* a *ex vivo* studie [10, 11]. Dosud však byla provedena jen jedna experimentální studie na modelu endotoxémie u králíka [12]. V této studii byla léčba CPFA zahájena před podáním endotoxinu a výsledkem bylo lepší krátkodobé přežívání (72 h) u léčené skupiny [12]. V klinické studii [11] u deseti pacientů v septickém šoku Ronco et al. ukázali, že desetihodinová léčba CPFA zlepší systémovou hemodynamiku a reaktivitu leukocytů více než hemofiltrace [11]. Formica et al. v observační klinické studii, bez kontrolní skupiny, zkoumali efekt opakované léčby CPFA na hemodynamiku u dvanácti pacientů v septickém šoku. V této studii pozorovali zvýšení středního arteriálního tlaku a vyšší než predikované přežívání nemocných [13]. U obou těchto klinických studií [11, 13] je výpovědní hodnota slibných a pozitivních výsledků limitována především velikostí souborů sledovaných pacientů a absencí randomizace. Na základě těchto výsledků jsme provedli studii hodnotící hypotézu, že neselektivní odstraňování cirkulujících solubilních mediátorů metodou CPFA působí pozitivně v průběhu sepse. Tuto hypotézu jsme testovali na zvířecím modelu (sele) hyperdynamického septického šoku s tekutinovou resuscitací a podpůrnou léčbou. Abychom co nejvíce napodobili obvyklý průběh a získali klinicky relevantní data, zahajovali jsme léčbu CPFA až během plně rozvinuté sepse.

Materiál a metody

Experimentální práce byly provedeny v souladu se závaznými doporučeními pro práci s laboratorními zvířaty a schváleny etickou komisí Lékařské Fakulty UK v Plzni.

Anestezie a instrumentace experimentálních zvířat

V experimentech jsme použili 16 selat obou pohlaví vážících 34 kg [32, 38]. Jako premedikaci jsme intramuskulárně podali atropin (1 mg), ketamin (50 mg) a azaperon titrovaný podle klinického efektu. Na úvod do anestezie byl podán intravenózně atropin (0,5 mg), propofol 2% (1–2 mg · kg⁻¹), ketamin (2 mg · kg⁻¹) a pancuronium (4 mg). Po intubaci byla selata napojena na umělou plicní ventilaci (FiO₂ 0,4; PEEP 5–10 cm H₂O; dechový objem 10 ml · kg⁻¹; dechová frekvence byla nastavena tak, aby se cílový arteriální pCO₂ pohyboval mezi 4,0 a 5,0 kPa). Během chirurgické instrumentace byla celková anestezie vedena kontinuálním intravenózním podáváním thiopentalu (10 mg · kg⁻¹ · h⁻¹) a fentanyl (10–15 µg · kg⁻¹ · h⁻¹). Po dokončení operace byly sníženy dávky thiopentalu (5 mg · kg⁻¹ · h⁻¹) i fentanyl (5 µg · kg⁻¹ · h⁻¹) a touto rychlostí byly podávány do konce experimentu. Svalová relaxace byla zajištěna kontinuálním intravenózním podáváním pancuronu (0,2 mg · kg⁻¹ · h⁻¹) po celou dobu experimentu. Infuzní roztok PlasmaLyte byl podáván v průběhu chirurgické instrumentace rychlostí 15 ml · kg⁻¹ · h⁻¹, poté byla snížena dávka na 7 ml · kg⁻¹ · h⁻¹. Hladina glykémie v arteriální krvi byla udržována mezi 4,5–7 mmol · l⁻¹ infuzí 20% glukózy v průběhu celého experimentu.

Do levé jugulární žíly byl zaveden trojcestný centrální žilní katétr k podávání farmak a infuzí. Cestou pravé jugulární žíly byl zaveden plicnicový katétr. Do levé femorální tepny jsme zavedli katétr, který sloužil k invazivnímu monitorování krevního tlaku, sběru vzorků a zavádění fiberoptického katétru k měření nitrohrudního objemu krve (ITBV, intrathoracic blood volume) a extravaskulární plicní tekutiny (EVLW, extravascular lung water). Do pravé femorální žíly byla zavedena dialyzační kanyla, přes kterou byla selata napojována na CPFA. Po provedení horní střední laparotomie jsme na portální žílu, společnou jaterní tepnu a renální tepnu vlevo upevnili ultrazvukové průtokové sondy

(Transonic Systems, Ithaca, New York). Poté jsme do portální a renální žíly vlevo zavedli katétry ke sběru vzorků. Do jaterní žíly jsme zavedli katétr až po ukončení instrumentace pod ultrazvukovou kontrolou. Přímou na povrch ledviny, skrze incizi v renální kapsli, jsme umístili laser Doppler sondu (PF 404, Sutureable angled probe, Perimed, Jarfalla, Švédsko) sloužící k monitorování mikrocirkulace. Následovalo vyšíť dvouhlavňové ileostomie, kterou jsme použili k monitorování střevní mikrocirkulace, a to laser Doppler sondou (PF 409, Straight endoscopic probe, Perimed, Jarfalla, Švédsko) a intravitalní videomikroskopii (Microscan, MicroVision Medical, Amsterdam, Holandsko). Ileostomie byla mezi měřeními přikryta sterilní gázou navlhčenou fyziologickým roztokem a zakryta stomickým sáčkem. Na konci operace jsme umístili skrze břišní stěnu dva trubicové drény k derivaci ascitu a k indukci peritonitidy. Perkutánně jsme zavedli cystostomický katétr pod ultrazvukovou kontrolou a měřili výdej moči. Po uzavření laparotomie následovalo 6 hodin pooperační stabilizace. Současně s úvodem do anestezie bylo $0,5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ autologní stolice selete rozpuštěno ve 200 ml fyziologického roztoku a kultivováno ve vodní lázni při 37°C . Tento roztok byl použit následně k indukci peritonitidy.

Měření systémové a regionální hemodynamiky, mikrocirkulace a výpočty

Z parametrů systémové hemodynamiky byly měřeny tyto parametry: srdeční výdej, systémová vaskulární rezistence, ITBV a plnicí tlaky obou komor. Na úrovni regionální hemodynamiky hepatosplanchniku byly monitorovány průtoky krve portální žílou, společnou jaterní tepnou a levou renální tepnou. Odebírali jsme vzorky arteriální, portální, jaterní a renální žilní krve k analýze pH, pO_2 , pCO_2 a saturaci hemoglobinu kyslíkem. Následně jsme podle obvyklých vzorců vypočítávali systémovou a především regionální dodávku kyslíku, spotřebu kyslíku jater a ledviny [14–16].

Mikrovaskulární perfuze sliznice ilea a kůry ledviny byla hodnocena za použití laser dopplerometrické metody (LDF) hodnocením perfuzních jednotek při adekvátním zpětném odraženém signálu (back scattered light) [14–16]. Současně jsme využili techniku intravitalní videomikroskopie (SDF, Side-stream Dark imaging) k přímému zobrazení mikrocirkulace sliznice ilea. Během každého měření jsme natočili ze tří různých míst sliznice ilea dvacetivteřinovou videosekvenci. Za pomoci softwaru vyvinutého k hodnocení těchto sekvencí: Microscan Analyzing Software (MicroVision Medical, Amsterdam, The Netherlands) jsme určovali microvascular flow index (MFI) a flow heterogeneity index (FHI) [17, 18]. MFI je založen na hodnocení jednotlivých charakterů průtoku v kapilárách a cévách do 20 mikrometrů průměru v každém ze 4 kvadrantů videosekvence (žádný průtok = 0, intermitentní = 1, zpomalený = 2, kontinuální = 3). Průměr hodnot z jednotlivých kvadrantů je MFI, v naší studii jako výsledek uvádíme průměrný MFI ze tří náhodně vybraných lokalit sliznice ilea. FHI ukazuje spíše než na

charakter průtoku na prostorovou heterogenitu perfuze. Výpočet FHI provádíme jako rozdíl mezi nevyšší a nejnižší hodnotou MFI dělenou průměrným MFI [17].

Odběr a hodnocení vzorků krve, plazmy a tkání

Z arteriální, portální, jaterní a renální žilní krve jsme stanovili koncentrace laktátu (L) a pyruvátu (P), dále byly stanoveny arteriální sérová hladina alanin aminotransferázy (ALT) a poměru ketolátů z jaterní žilní krve (KBR, acetoacetát/ β -hydroxybutyrát) [14–16]. K posouzení oxidativního a nitrosativního stresu jsme použili měření arteriálních reaktantů s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS, thiobarbituric acid reactive species) a koncentraci arteriálních nitrátů a nitritů [14–16]. Z arteriální krve jsme stanovili také aktivitu von Willebrandova faktoru (vWF), koncentraci komplexů trombinu-antitrombinu (TAT), počet krevních destiček, koncentraci asymetrického dimethylargininu (ADMA), tumor necrosis faktoru alfa ($\text{TNF-}\alpha$) interleukinu 6 (IL-6) a arteriální hladiny neuropeptidu Y (NPY) a vazomotorického intestinálního peptidu (VIP). Všechny vzorky jsme hodnotili dvojmo a abychom odstranili efekt hemodiluze při objemové resuscitaci, korigovali jsme následující hodnoty na celkovou bílkovinu: NOx, TBARS, ADMA, ALT, vWF, TAT, NPY a VIP [14–16].

Protokol studie

První měření a sběry vzorků byly provedeny po 6hodinovém zotavení z chirurgické instrumentace. Následovala indukce peritonitidy inokulací $0,5 \text{ g/kg}$ autologní stolice rozpuštěné v 200 ml fyziologického roztoku do břišní dutiny jedním z drénů. Druhý set měření a sběru vzorků byl proveden po 12 hodinách od indukce peritonitidy. V této době byla již plně rozvinutá hyperdynamická sepsis, tekutinově resuscitovaná kyslaloidem i koloidem podle protokolu. Poté byla zvířata rozdělena do kontrolní skupiny (Control, $n = 8$) s podpůrnou léčbou, nebo byla navíc napojena na CPFA (CPFA, $n = 8$) na 10 hodin; další měření byla provedena v 18. a 22. hodině, v průběhu CPFA.

Tekutinová resuscitace

K základní udržovací infuzi roztoku Plasma Lyte jsme od šesté hodiny od indukce peritonitidy přidali infuzi 6% hydroxyetylškrobu 130 kD/ $0,4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (7 ml $\cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ v případě, že byl CVP nebo PAOP vyšší než 18 mm Hg) tak, abychom udrželi plnicí tlaky komor vyšší než 12 mm Hg. Kontinuální infuze noradrenalinu byla zahájena, pokud se tekutinovou resuscitací nedařilo udržet střední arteriální tlak (MAP) nad 65 mm Hg. Poté, co jsme získali poslední set měření a odebrali poslední vzorky, byla zvířata utracena za hluboké celkové anestezie injekcí KCl.

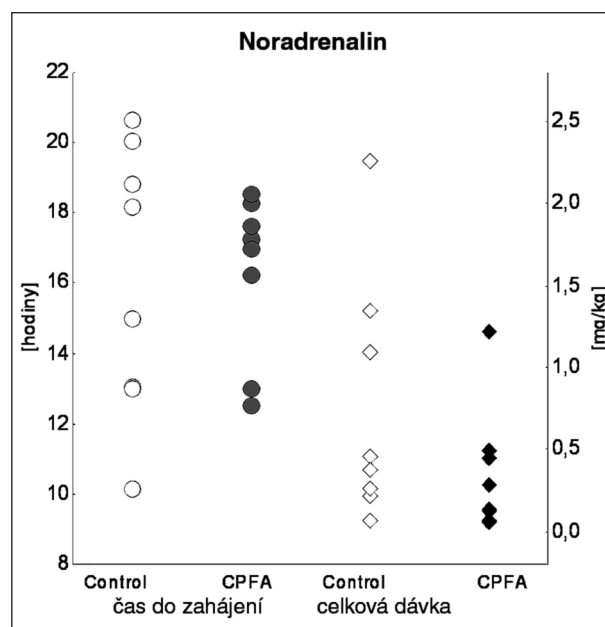
Nastavení CPFA

Léčba CPFA byla prováděna na komerčně dostupném přístroji určeném k různým modalitám extrakorporální hemolimace (LYNDA, Bellco®, Miranda, Itálie), za použití kitu CPFA kit (ABL 814, Bellco SpA), který obsahuje polyétersulfonový plazmafiltr (MPS 05, $0,5 \text{ m}^2$) v sérii

s vysoce propustným polyétersulfonovým hemofiltrem (HFT 14, 1,4 m², Bellco SpA) a adsorpční kapslí obsahující styrenovou pryskyřici s makroporézní strukturou (Mediasorb, 50 000 m²/cartridge). Průtok krve byl nastaven na 150 ml · min⁻¹, objem separované plazmy na 20 % v plazmafiltru (průtok plazmy 30 ml · min⁻¹). Poté, co byla plazma očištěna v adsorpční kapsli společně se zbytkem krve, ještě prošla hemofiltrem, na kterém byla nastavena hemofiltrace 35 ml · kg⁻¹ · h⁻¹ s nulovou ultrafiltrací. K substituci byl použit bikarbonátový (35 mmol · l⁻¹) roztok, který byl napojen postdilučním způsobem. K prevenci poklesu tělesné teploty v mimotělním okruhu byl substituční roztok ohříván na 39 °C v hemoeliminačním přístroji a současně byl zapojen na venózní linku i ohříváč HOTLINE®. K antikoagulaci všech zvířat jsme použili intravenózní bolus 0,2 ml · 10 kg⁻¹ nadroparinu před napojením na CPFA. V průběhu studie jsme neměnili ani filtry, ani adsorpční kapsle.

Použité statistické metody

Hodnoty výsledků prezentujeme jako medián a 25. a 75. percentil (interkvartilové rozpětí). Absenci normálního rozložení hodnot jsme testovali testem normality Kolmogorovova-Smirnovova. Rozdíly v čase před indukci a po indukci peritonitidy v rámci jedné skupiny byly otestovány statistickým testem ANOVA při opakovaných měřeních (Friedman ANOVA on ranks), za následného použití post hoc Dunnova testu pro identifikaci statisticky významných rozdílů při mnohočetném porovnávání. Rozdíly mezi skupinami v měřených intervalech byly testovány za pomoci Mannova-Whitneyova



Graf 1. Podpora oběhu noradrenalinem

V prvních dvou bodových grafech (kolečka) je zobrazen čas do zahájení infuze noradrenalinu a druhé dva bodové grafy (čtverečky) vyjadřují celkovou dávku noradrenalinu v kontrolní skupině (bílé) a CPFA skupině (šedé).

U testu (rank sum test). Grafy jsou buď jednoduché bodové grafy, nebo standardní krabicové grafy zobrazující medián, interkvartilové rozpětí a rozpětí rozsahu neodlehklých hodnot (koeficient 1,5).

Tabulka 1. Systémová hemodynamika, kyslíkový metabolismus a acidobazická rovnováha

	Skupina	Před indukci peritonitidy	12 hodin sepse	18 hodin sepse	22 hodin sepse
MAP [mm Hg]	Control	96 (89;98)	80 (73; 93)	75 (68; 83) ^a	72 (66; 76) ^a
	CPFA	95 (88;113)	98 (82;102)	73 (70; 76) ^a	70 (67; 72) ^a
MPAP [mm Hg]	Control	24 (21; 28)	31 (28; 37) ^a	42 (34; 46) ^a	44 (41; 47) ^a
	CPFA	22 (21; 25)	28 (26; 39) ^a	36 (32; 42) ^a	43 (35; 47) ^a
CO [ml/kg]	Control	79 (64; 102)	113 (95; 164) ^a	140 (116; 178) ^a	174 (120; 191) ^a
	CPFA	88 (73; 106)	111 (107; 133) ^a	121 (104; 140) ^a	155 (130; 190) ^a
SVR [dyne.sec/cm ⁵]	Control	2595 (1973; 2809)	1523 (968; 1917) ^a	964 (683; 1263) ^a	757 (600; 852) ^a
	CPFA	2552 (1921; 3046)	1575 (1294; 1763) ^a	1173 (920; 1399) ^a	785 (660; 981) ^a
ITBV [ml/kg]	Control	22 (19; 23)	25 (19; 25)	27 (22; 28)	21 (17; 24)
	CPFA	23 (22; 24)	25 (23; 27)	23 (22; 26)	27 (23; 36)
DO ₂ [ml/min/kg]	Control	11 (9; 13)	16 (14; 27) ^a	16 (15; 21) ^a	24 (13; 27) ^a
	CPFA	11 (10; 13)	16 (13; 18) ^a	14 (10; 17) ^a	17 (16; 18) ^a
VO ₂ [ml/min/kg]	Control	5 (4; 6)	6 (5; 8)	6 (5; 6)	7 (5; 9)
	CPFA	5 (5; 7)	6 (6; 7)	5 (5; 7)	6 (5; 7)
Arteriální pH	Control	7,54 (7,52; 7,60)	7,45 (7,43; 7,49) ^a	7,41 (7,20; 7,47) ^a	7,31 (7,08; 7,36) ^a
	CPFA	7,52 (7,49; 7,62)	7,48 (7,44; 7,52) ^a	7,40 (7,30; 7,49) ^a	7,35 (7,27; 7,41) ^a
Base excess [mmol/l]	Control	5 (4; 7)	4 (-1; 6)	2 (-9; 4) ^a	-3 (-15; 0)
	CPFA	6 (5; 7)	4 (2; 5) ^a	0 (-4; 2) ^a	-3 (-6; -1) ^a
Oxygenační index [paO ₂ /FiO ₂]	Control	447 (345; 488)	340 (288; 346) ^a	270 (145; 320) ^a	129 (92; 160) ^a
	CPFA	502 (478; 597)	423 (371; 440) ^a	298 (97; 362) ^a	147 (85; 269) ^a
Teplota tělesného jádra [°C]	Control	38,2 (36,9; 39,2)	39,7 (38,0; 41,1) ^a	39,1 (36,9; 39,9)	38,3 (37,0; 39,7)
	CPFA	38,1 (37,6; 39,4)	40,1 (39,0; 40,4) ^a	37,4 (36,8; 38,1)	36,8 (36,5; 37,9) ^b

MAP – střední arteriální tlak, CO – srdeční výdej, MPAP – střední tlak v plicnici, SVR – systémová cévní rezistence, ITBV – nitrohruční objem krve, DO₂ – systémová dodávka kyslíku, VO₂ – systémová spotřeba kyslíku, CPFA – plazmafiltrace spojená s adsorpcí, ^asignifikanční rozdíl v čase vs před indukci peritonitidy (p < 0,05), ^bsignifikanční rozdíl oproti kontrolní skupině

Výsledky

Ve vstupních hodnotách nebyly žádné statisticky významné rozdíly mezi oběma skupinami.

Systémová hemodynamika, kinetika kyslíku, metabolismus a plicní funkce

Celkové množství koloidních roztoků nutných k udržení srovnatelného srdečního preloadu se mezi skupinami nelišilo (Control 169 [148; 209], CPFA 188 [147; 211] ml · kg⁻¹) – tabulka 1. Tekutinovou resuscitací byly udrženy ITBV i plicní tlaky (data nejsou prezentována) bez meziskupinových rozdílů. Všechna selata rozvinula hyperdynamickou cirkulaci s narůstajícím srdečním výdejem a nízkou systémovou vaskulární rezistencí. U všech selat jsme museli použít podporu oběhu noradrenalinem. Medián času do rozvoje arteriální hypotenze, definované poklesem MAP pod 65 mm Hg, a stejně tak i dávka noradrenalinu se nelišily mezi skupinami (graf 1). U všech zvířat vedl zvýšený srdeční výdej k významnému zvýšení celkové dodávky kyslíku, zatímco celková spotřeba kyslíku se v průběhu času nezměnila. U všech zvířat jsme také pozorovali rozvoj metabolické acidózy a postupný pokles poměru PaO₂/FiO₂ bez meziskupinového rozdílu. Ve skupině CPFA došlo k poklesu teploty tělesného jádra na konci experimentu oproti vstupním hodnotám. Množství ascitu a EVLW bylo stejné u obou skupin (data nejsou prezentována).

Regionální hemodynamika, mikrocirkulace, energetický metabolismus a orgánové funkce

Průtoky krve játry a ledvinou, regionální dodávka a spotřeba kyslíku byla obdobná v obou skupinách

(tab. 2). I přes dobrou regionální perfuzi orgánů docházelo k progresivnímu zhoršování mikrocirkulace sliznice ilea a ledvinné kůry u obou skupin bez rozdílu (viz tab. 2). Zhodnocení přímého zobrazení mikrocirkulace sliznice ilea (SDF) ukazovalo na zhoršování charakteru průtoku (MFI) u obou skupin bez rozdílu, ale mikrovaskulární perfuze sliznice ilea vykazovala významně vyšší heterogenitu (FHI) v průběhu léčby CPFA. Sepse při peritonitidě v našem modelu vedla k progresivní metabolické acidóze v portální, jaterní i ledvinné žíle, současně se zvýšeným regionálním poměrem laktátu a pyruvátu a sníženým poměrem KBR – tyto hodnoty nebyly léčbou CPFA ovlivněny. U skupiny s CPFA narůstala ke konci experimentu sérová koncentrace ALT, zatímco u kontrolní skupiny jsme tento nárůst nepozorovali. Kontrolní skupina vyvinula akutní poškození ledvin s významným zvýšením koncentrace sérového kreatininu a podle očekávání hemofiltrace spojená s CPFA zabránila vzestupu hodnot kreatininu u skupiny CPFA (tab. 3).

Oxidativní/nitrosativní stres, koagulace, endoteliální dysfunkce a zánět

V průběhu peritonitidy došlo ke zvýšení hodnot NOx a TBARS v arteriální krvi (graf 2). Nárůst těchto markerů nitrosativního/oxidativního stresu byl více vyjádřen u skupiny léčené CPFA. Ve srovnání s kontrolními zvířaty docházelo u skupiny léčené CPFA k prudšímu poklesu počtu krevních destiček a vyšší intravaskulární tvorbě komplexů TAT (graf 3). Postupný nárůst aktivity vWf a ADMA v sepsi nebyl léčbou CPFA ovlivněn (viz graf 3). Systémová zánětlivá odpověď byla provázena nárůstem plazmatických hladin TNF-α and IL-6 u všech zvířat bez rozdílu. CPFA také neovlivnila nárůst plazmatických koncentrací NPY a VIP (tab. 4).

Tabulka 2. Regionální hemodynamika, metabolismus kyslíku a mikrocirkulace

	Skupina	Před indukci peritonitidy	12 hodin sepsse	18 hodin sepsse	22 hodin sepsse
Průtok krve játry [ml/kg/min]	Control	23 (21; 30)	37 (30; 44) ^a	36 (28; 45) ^a	39 (26; 42) ^a
	CPFA	20 (16; 24)	36 (30; 41) ^a	39 (35; 47) ^a	28 (26; 40) ^a
Jaterní DO ₂ [ml/min/kg]	Control	1,8 (1,5; 2,1)	4,2 (3,3; 4,5) ^a	3,9 (3,3; 4,3) ^a	2,8 (2,3; 3,3) ^a
	CPFA	1,8 (1,7; 2,5)	3,4 (2,5; 4,5) ^a	2,7 (2,1; 3,7) ^a	2,5 (1,5; 3,2)
Jaterní VO ₂ [ml/min/kg]	Control	0,9 (0,8; 1,1)	0,8 (0,5; 1,0)	1,1 (0,7; 1,3)	1,1 (0,7; 1,5)
	CPFA	0,9 (0,4; 1,4)	0,9 (0,9; 1,2)	1,1 (0,5; 1,4)	0,8 (0,4; 1,0)
Průtok krve ledvinou [ml/kg/min]	Control	6 (4; 8)	5 (4; 8)	6 (4; 7)	4 (2; 4) ^a
	CPFA	5 (4; 7)	6 (4; 8)	5 (3; 6)	4 (2; 6)
Ledvinná DO ₂ [ml/min/kg]	Control	0,8 (0,6; 1,0)	0,9 (0,5; 1,2)	0,7 (0,5; 0,9)	0,5 (0,1; 0,6)
	CPFA	0,6 (0,4; 1,0)	0,7 (0,7; 0,9)	0,5 (0,3; 0,7)	0,4 (0,2; 0,6)
Ledvinná VO ₂ [ml/min/kg]	Control	0,2 (0,1; 0,2)	0,2 (0,1; 0,2)	0,2 (0,1; 0,2)	0,2 (0,1; 0,2)
	CPFA	0,2 (0,1; 0,2)	0,2 (0,2; 0,3)	0,2 (0,1; 0,2)	0,1 (0,1; 0,2)
Mikrocirkulace sliznice ilea [perfuzní jednotky]	Control	123 (103; 144)	84 (67; 98) ^a	51 (50; 77) ^a	68 (50; 96) ^a
	CPFA	141 (98; 159)	98 (70; 109) ^a	92 (66; 107) ^a	54 (49; 88) ^a
Mikrocirkulace kůry ledviny [perfuzní jednotky]	Control	136 (140; 191)	93 (77; 108) ^a	112 (96; 119) ^a	73 (53; 106) ^a
	CPFA	138 (82; 168)	59 (52; 126) ^a	53 (31; 111) ^a	59 (38; 61) ^a

Jaterní DO₂ – dodávka kyslíku do jater, jaterní VO₂ – spotřeba kyslíku játry, ledvinná DO₂ – dodávka kyslíku do ledviny, ledvinná VO₂ – spotřeba kyslíku ledvinou, CPFA – plazmafiltrace spojená s adsorpcí, ^asignifikanční rozdíl v čase vs před indukci peritonitidy (p < 0,05).

Tabulka 3. Regionální acidobazická rovnováha a energetický metabolismus

	Skupina	Před indukci peritonitidy	12 hodin sepse	18 hodin sepse	22 hodin sepse
pH portální žilní krve	Control	7,46 (7,43; 7,52)	7,39 (7,37; 7,44)	7,36 (7,16; 7,41) ^a	7,27 (7,02; 7,29) ^a
	CPFA	7,45 (7,40; 7,47)	7,41 (7,37; 7,45) ^a	7,34 (7,25; 7,41) ^a	7,29 (7,23; 7,32) ^a
pH jaterní žilní krve	Control	7,45 (7,43; 7,50)	7,39 (7,37; 7,42) ^a	7,36 (7,19; 7,40) ^a	7,27 (7,01; 7,29) ^a
	CPFA	7,46 (7,41; 7,52)	7,41 (7,39; 7,43) ^a	7,35 (7,28; 7,42) ^a	7,30 (7,23; 7,36) ^a
pH reální žilní krve	Control	7,53 (7,50; 7,57)	7,42 (7,42; 7,47) ^a	7,40 (7,21; 7,4) ^a	7,31 (7,05; 7,35) ^a
	CPFA	7,51 (7,46; 7,58)	7,46 (7,42; 7,49) ^a	7,37 (7,34; 7,43) ^a	7,32 (7,27; 7,38) ^a
Poměr L/P v portální žilní krvi	Control	9 (6; 14)	14 (10; 20) ^a	22 (12; 31) ^a	29 (18; 35) ^a
	CPFA	7 (5; 12)	11 (9; 17)	11 (6; 17)	25 (17; 28) ^a
Poměr L/P v jaterní žilní krvi	Control	4 (2; 8)	9 (3; 15) ^a	14 (12; 21) ^a	16 (9; 25) ^a
	CPFA	4 (3; 4)	6 (4; 9)	8 (5; 10) ^{a,b}	19 (18; 22) ^a
Poměr L/P v ledvinové žilní krvi	Control	11 (8; 13)	11 (8; 12)	15 (8; 21)	25 (17; 39) ^a
	CPFA	5 (5; 6)	4 (4; 9)	8 (6; 15) ^a	12 (8; 28) ^a
Poměr ketolátek v jaterní žilní krvi	Control	1,8 (1,2; 2,3)	1,9 (1,1; 2,3)	1,3 (0,5; 2,1) ^a	0,7 (0,6; 0,8) ^a
	CPFA	2,0 (1,6; 2,3)	2,2 (1,8; 2,5)	1,4 (1,0; 1,7) ^a	0,6 (0,3; 0,9) ^a
ALT [nkat/g proteinu]	Control	14 (12; 17)	16 (11; 18)	17 (12; 21)	18 (12; 19)
	CPFA	14 (13; 17)	17 (16; 21) ^a	21 (17; 25) ^a	21 (18; 26) ^a
Kreatin [umol/l]	Control	93 (91; 101)	105 (81; 128) ^a	122 (89; 141) ^a	130 (101; 153) ^a
	CPFA	111 (93; 113)	119 (86; 126)	92 (86; 104)	102 (96; 111)

L/P – poměr laktát/pyruvát, ALT – alanin aminotransferáza, CPFA – plazmafiltrace spojená s adsorpcí, ^asignifikanční rozdíl v čase vs před indukci peritonitidy ($p < 0,05$), ^bsignifikanční rozdíl oproti kontrolní skupině

Tabulka 4. Zánětlivé cytokiny a neuropeptidy

	Skupina	Před indukci peritonitidy	12 hodin sepse	18 hodin sepse	22 hodin sepse
TNF- α [pg/ml]	Control	58 (39; 98)	86 (54; 260) ^a	104 (63; 193) ^a	163 (79; 658) ^a
	CPFA	62 (49; 66)	156 (112; 189) ^a	278 (113; 317) ^a	347 (178; 423) ^a
IL-6 [pg/ml]	Control	201 (32; 251)	808 (308; 1567) ^a	2344 (1003; 3589) ^a	8465 (3847; 10391) ^a
	CPFA	165 (69; 282)	862 (549; 2837) ^a	2608 (1825; 7155) ^a	8864 (3504; 19410) ^a
NPY [ng/g proteinu]	Control	3,7 (3,2; 4,4)	12,3 (9,8; 15,0) ^a	neměřeno	15,8 (9,3; 21,9) ^a
	CPFA	3,5 (3,2; 4,0)	8,0 (5,7; 11,6) ^a	neměřeno	21,1 (16,2; 28,6) ^a
VIP [ng/g proteinu]	Control	0,2 (0,1; 0,3)	0,7 (0,5; 0,8) ^a	neměřeno	0,8 (0,6; 0,8) ^a
	CPFA	0,2 (0,1; 0,2)	0,4 (0,2; 0,7) ^a	neměřeno	1,0 (0,6; 1,2) ^a

TNF- α – plazmatické hladiny tumor necrosis faktoru alfa, IL-6 – plazmatické hladiny interleukinu 6; NPY – plazmatické hladiny neuropeptidu Y, VIP – plazmatické hladiny vazoaktivního intestinálního peptidu, CPFA – plazmafiltrace spojená s adsorpcí, ^asignifikanční rozdíl v čase vs před indukci peritonitidy ($p < 0,05$), ^bsignifikanční rozdíl oproti kontrolní skupině

Dikuse

V této, dosud první kontrolované experimentální studii navržené ke zhodnocení účinnosti CPFA jsme použili klinicky relevantní model, ve kterém jsme zahajovali CPFA až v plně rozvinuté hyperdynamické sepsi (post-inzult režim). Cílem naší práce bylo zhodnotit nejen hemodynamiku, ale také různé biologické systémy hrající významnou úlohu v patogenezi sepse. Hlavními výsledky naší studie dokládají, že léčba CPFA:

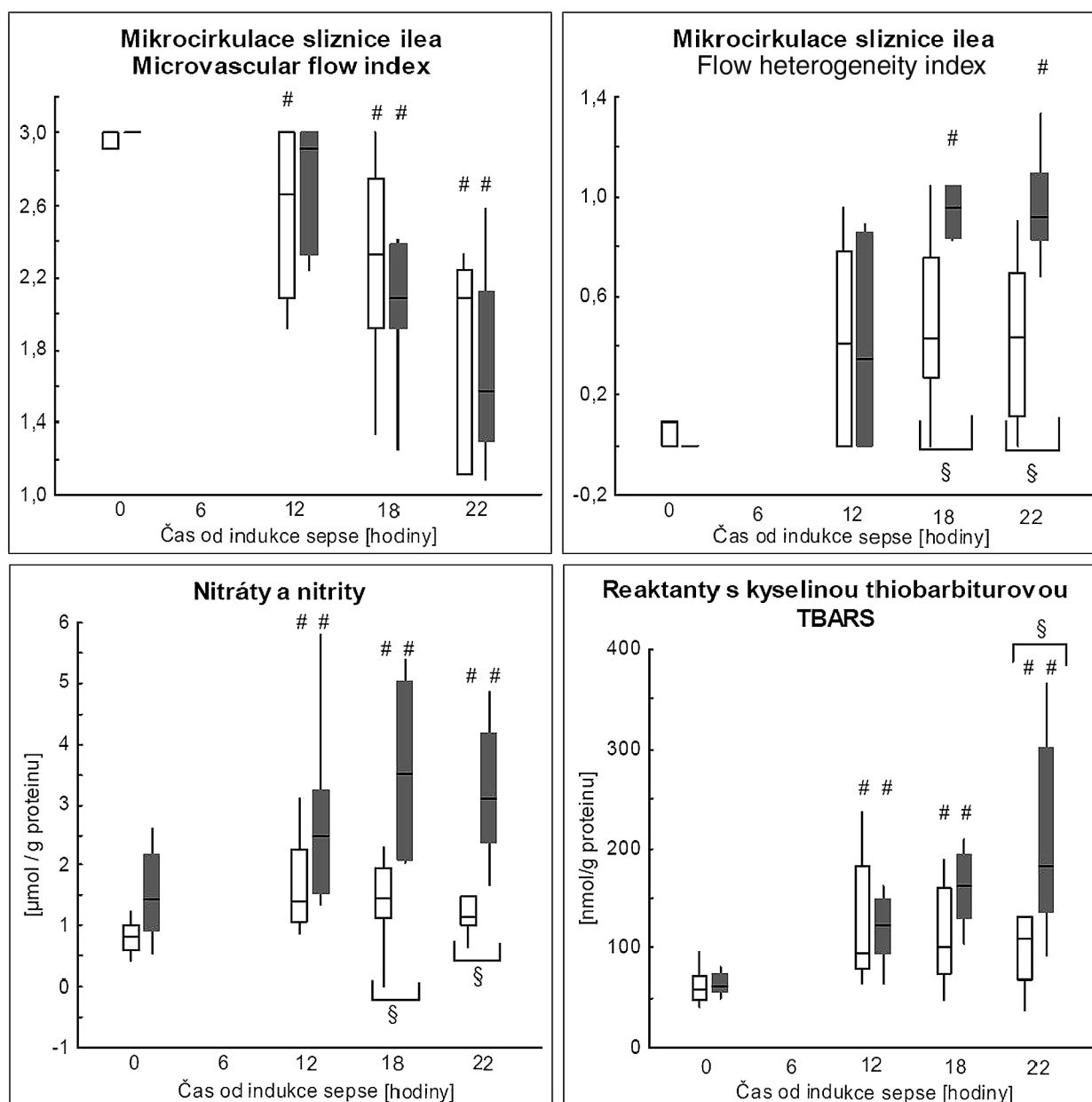
1. nezabránila rozvoji hypotenze a progresi sepse do septického šoku;
2. nedokázala pozitivně ovlivnit poškození mikrocirkulace, energetického metabolismu a orgánových funkcí;
3. dokonce zhoršila sepsi indukovanou poruchu koagulace a parametry oxidativního/nitrosativního stresu.

Dosud byla publikována jen jediná experimentální

studie zabývající se účinkem CPFA v preklinickém modelu [12]. Účinek CPFA byl zkoumán na králíciím modelu endotoxinového šoku navozeného letálním bolusem endotoxinu *E. coli*. V této studii byla léčba CPFA spojena s prodloužením doby přežití (72 hodin) [12]. Studie je však omezena řadou limitací:

- a) výsledkem bolusového podání endotoxinu a absence tekutinové resuscitace byl hypodynamický endotoxinový šok, který je zcela v protikladu k obvyklé klinické situaci;
- b) léčba CPFA byla zahájena před indukci šoku, tzn. ve schématu, které nelze klinicky uplatnit.

V naší studii jsme zahajovali léčbu CPFA v plně rozvinuté polymikrobiální sepsi (po 12 hodinách od inzultu) s hyperdynamickou cirkulací, poruchou mikrocirkulace, známkami systémového zánětu a metabolické alterace. V tomto nastavení studie za použití přísně protokolem řízené tekutinové resuscitace, umělé plicní ventilace a podpůrné terapie, které není plánováno k hodnocení přežití, jsme během 10hodinové léčby CPFA nepozorovali žádné pozitivní ukazatele svědčící



Graf 2. Arteriální hypotenze

Horní vlevo: Microvascular flow index, mikrocirkulace sliznice ilea hodnocená sidestream darkfield imaging.

Horní vpravo: Flow heterogeneity index, mikrocirkulace sliznice ilea hodnocená sidestream darkfield imaging.

Dolní vlevo: Plazmatické hladiny nitrátů a nitritů.

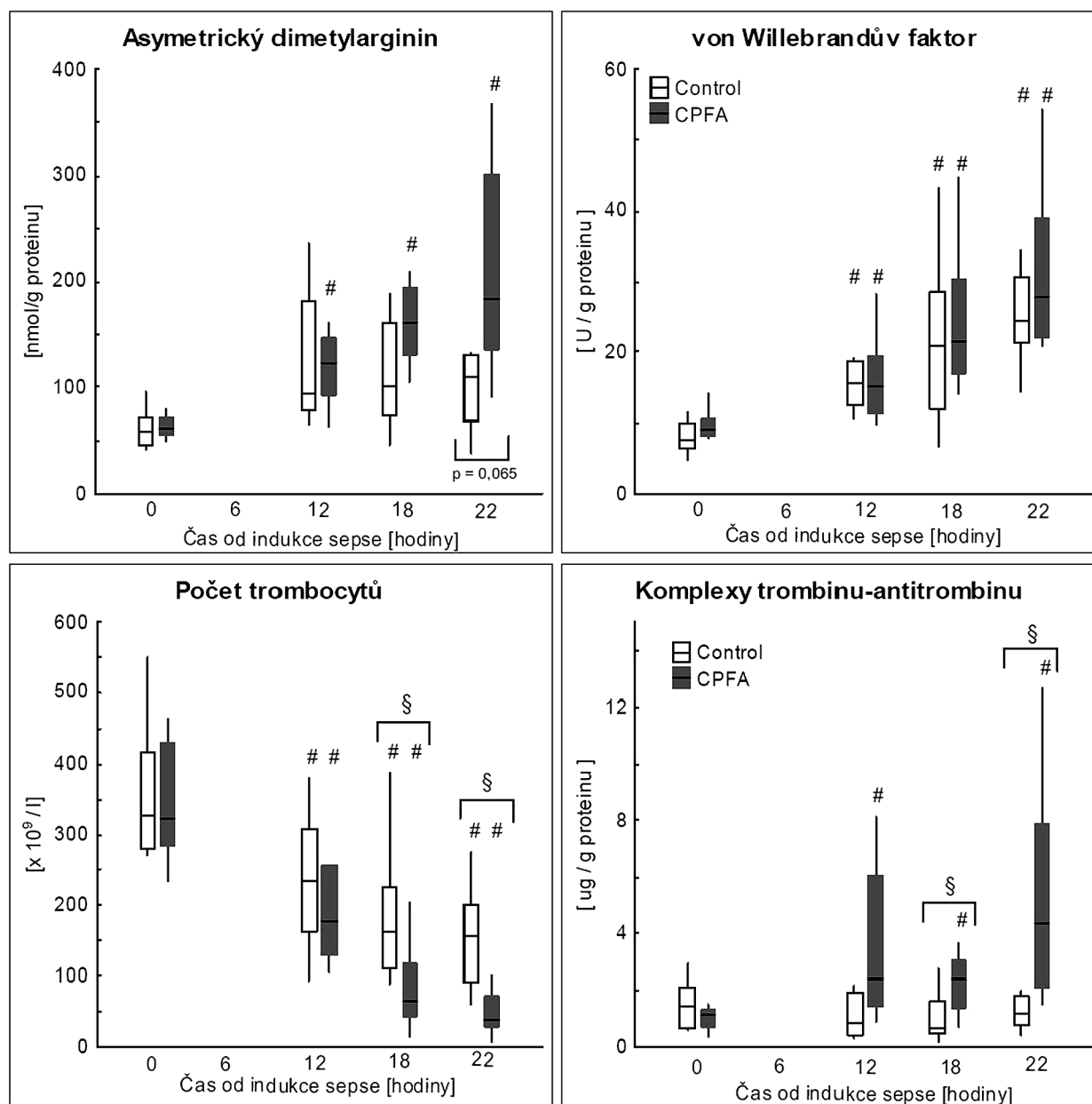
Dolní vpravo: Plazmatické hladiny reaktantů s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS).

Kontrolní skupina (bílé krabice) a CPFA skupiny (šedé krabice), #signifikantní rozdíl v čase vs před indukci peritonitidy ($p < 0,05$), §signifikantní rozdíl mezi skupinami ($p < 0,05$)

cí ve prospěch této léčby. Rozdíl v naší studii je oproti výše zmíněnému experimentálnímu modelu především v rozdílném načasování hemopurifikace, což je velmi důležité pro interpretaci výsledků těchto dvou studií. Toto je podporováno výsledky experimentálních studií hemofiltrace v sepsi, ve kterých bylo lepších výsledků dosahováno zejména tehdy, pokud byla eliminace zahájena krátce po septickém inzultu, nebo mu dokonce předcházela [19]. Prodloužení doby přežití ve studii Tetty et al. však nebylo spojeno s jednoznačným zlepšením hemodynamické stabilizace, redukcí cirkulujícího bioaktivního TNF- α , plazmatického lipopoly-

sacharidu či zmenšením tíže metabolické acidózy [12].

V naší studii jsme hodnotili několik klinicky relevantních a vzájemně nezávislých ukazatelů, jako jsou mikrocirkulace, energetický metabolismus, oxidativní stres, dysfunkce endotelu, systémový zánět a orgánové funkce. V této šíři ukazatelů není pravděpodobné, že by unikl některý z pozitivních léčebných efektů metody CPFA. Lze namítat, že delší doba CPFA by mohla přinést signifikantní změny v některých našich výstupech. Doba studie je však stejná jako u obou malých pilotních klinických studií [11, 13], v nichž byl pozorován vzestup MAP již po 10hodinové léčbě CPFA



Graf 3. Vliv léčby CPFA

Horní vlevo: Plazmatické hladiny asymetrického dimetylgargininu.

Horní vpravo: Plazmatické hladiny von Willebrandova faktoru.

Dolní vlevo: Počet trombocytů.

Dolní vpravo: Komplexy trombinu-antitrombinu.

Kontrolní skupina (bílé krabice) a CPFA skupiny (šedé krabice), #signifikantní rozdíl v čase vs před indukci peritonitidy ($p < 0,05$), §signifikantní rozdíly mezi skupinami ($p < 0,05$)

a na základě jejichž výsledků bychom případné pozitivní účinky měli pozorovat také v průběhu naší studie. Léčba CPFA působila dokonce škodlivě na koagulaci, především poklesem počtu destiček a nárůstem komplexů TAT, a současně zhoršovala oxidativní a nitrosativní stres, jak je vyjádřeno nárůstem TBARS a nitrátů a nitritů. Prokoagulační aktivita CPFA společně s významně zhoršenou heterogenitou mikrovaskulární perfuze (FHI) u zvířat léčených CPFA může vybízet ke spekulaci o zvýšené tvorbě mikrovaskulární trombózy. Námi pozorované nežádoucí účinky CPFA mohou být přisouzeny tzv. bioinkompatibilitě metody

(tj. aktivaci humorální i buněčné imunitní odpovědi při interakci krve s umělým materiálem) nebo také možnosti, že dochází k odstraňování prospěšných a nezbytných molekul. Kontakt krve s cizím povrchem, jakým je dialyzační membrána, vede k aktiní zánětlivé odpovědi, aktivaci koagulace a vyšší produkci kyslíkových radikálů a oxidu dusnatého, jak bylo prokázáno u chronicky dialyzovaných nemocných [20–23]. Toto tvrzení podporuje i vyšší spontánní produkce $\text{TNF-}\alpha$ *in vitro* u plné krve nemocných, která byla pozorována po ukončení léčbou CPFA; tento efekt byl v nejvyšší míře pozorován po průchodu krve hemofiltrem [11].

Obdobně v průběhu frakcionované separace plazmy a adsorpce byly pozorovány významné poruchy koagulace [24] a byl dokumentován pokles počtu krevních destiček u septických pacientů léčených adsorpčním systémem založeným na imobilizovaném lidském albuminu [25]. Navíc poruchy mikrocirkulace byly v recentních studiích použity jako další možné ukazatele bio(in)kompatibility [26, 27]. Prozatím nelze vyloučit, že prozánětlivé, prokoagulační a prooxidační účinky CPFA mohou omezovat její účinnost. V našem pokusu jsme se zaměřili na hodnocení bioinkompatibilit, a také proto jsme nezařazovali skupinu, u které bychom hodnotili účinek okruhu CPFA *per se*, a ani jsme nenabírali vzorky před adsorpční kapslí a za ní.

Závěr

V tomto modelu septického šoku při peritonitidě nezabránilo časné zahájení CPFA rozvoji poruchy hemodynamiky a ostatních patofyziologických odpovědí, navíc jsme zaznamenali vliv na zhoršení oxidativního stresu a koagulační dysfunkci. Selhání účinnosti CPFA metody a naopak riziko nežádoucích účinků, plynoucích pravděpodobně z procesů bioinkompatibilit, dokládá nutnost dalších studií, které musí dostatečně zhodnotit jak účinnost, tak bezpečnost této jinak koncepčně perspektivní metody. Do té doby nelze CPFA metodu přes slibné výsledky pilotních klinických studií či kazuistik doporučit pro klinické účely.

Literatura

1. **Bellomo, R. et al.** Extracorporeal blood treatment (EBT) methods in SIRS/Sepsis. *Int. J. Artif. Organs*, 2005, 28, p. 450–458.
2. **Vincent, J. L. et al.** A pilot-controlled study of a polymyxin B-immobilized hemoperfusion cartridge in patients with severe sepsis secondary to intra-abdominal infection. *Shock*, 2005, 23, p. 400–405.
3. **Schefold, J. C. et al.** A novel selective extracorporeal intervention in sepsis: immunoabsorption of endotoxin, interleukin 6, and complement-activating product 5a. *Shock*, 2007, 28, p. 418–425.
4. **Formica, M. et al.** Coupled plasma filtration adsorption. *Contrib. Nephrol.*, 2007, 156, p. 405–410.
5. **Bellomo, R. et al., Tetta, C., Ronco, C.** Coupled plasma filtration adsorption. *Intensive Care Med.*, 2003, 29, p. 1222–1228.
6. **Ronco, C. et al.** Coupled plasma filtration adsorption: rationale, technical development and early clinical experience. *Blood Purif.*, 2003, 21, p. 409–416.
7. **Tetta, C. et al.** Use of adsorptive mechanisms in continuous renal replacement therapies in the critically ill. *Kidney Int. Suppl.*, 1999, 72, p. S15–S19.
8. **Winchester, J. F. et al.** Sorbents in acute renal failure and the systemic inflammatory response syndrome. *Blood Purif.*, 2003, 21, p. 79–84.
9. **Cole, L. et al.** The effect of coupled haemofiltration and adsorption on inflammatory cytokines in and ex vivo model. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2002, 17, p. 1950–1956.
10. **Tetta, C. et al.** Removal of cytokines and activated complement components in an experimental model of continuous plasma filtration coupled with sorbent adsorption. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 1998, 13, p. 1458–1464.
11. **Ronco, C. et al.** A pilot study of coupled plasma filtration with adsorption in septic shock. *Crit. Care Med.*, 2002, 30, p. 1250–1255.
12. **Tetta, C. et al.** Coupled plasma filtration-adsorption in a rabbit model of endotoxic shock. *Crit. Care Med.*, 2000, 28, p. 1526–1533.
13. **Formica, M. et al.** Hemodynamic response to coupled plasmafiltration-adsorption in human septic shock. *Intensive Care Med.*, 2003, 29, p. 703–708.
14. **Matejovic, M. et al.** Selective inducible nitric oxide synthase inhibition during long-term hyperdynamic porcine bacteremia. *Shock*, 2004, 21, 458–465.
15. **Matejovic, M. et al.** Effects of tempol, a free radical scavenger, on long-term hyperdynamic porcine bacteremia. *Crit. Care Med.*, 2005, 33, p. 1057–1063.
16. **Matejovic, M. et al.** Effects of combining inducible nitric oxide synthase inhibitor and radical scavenger during porcine bacteremia. *Shock*, 2007, 27, p. 61–68.
17. **De Backer, D. et al.** How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Crit. Care*, 2007, 11, p. R101.
18. **Szabó, A. et al.** Flow motion in the intestinal villi during hemorrhagic shock: a new method to characterize the microcirculatory changes. *Shock*, 2004, 21, p. 320–328.
19. **Bouman, C. S. et al.** Hemofiltration in sepsis and systemic inflammatory response syndrome: the role of dosing and timing. *J. Crit. Care*, 2007, 22, p. 1–12.
20. **Hakim, R. M.** Clinical implications of biocompatibility in blood purification membranes. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2000, 15 (Suppl 2), p. 16–20.
21. **Pertosa, G. et al.** Clinical relevance of cytokine production in hemodialysis. *Kidney Int. Suppl.*, 2000, 76, p. S104–S111.
22. **Wratten, M. L. et al.** Oxidant stress in hemodialysis: prevention and treatment strategies. *Kidney Int. Suppl.*, 2000, 76, p. S126–S132.
23. **Gorbet, M. B. et al.** Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*, 2004, 25, p. 5681–5703.
24. **Meijers, B. K. et al.** Major coagulation disturbances during fractionated plasma separation and adsorption. *Am. J. Transplant.*, 2007, 7, p. 2195–2199.
25. **Reinhart, K. et al.** Open randomized phase II trial of an extracorporeal endotoxin adsorber in suspected Gram-negative sepsis. *Crit. Care Med.*, 2004, 32, p. 1662–1668.
26. **Teatini, U. et al.** Microcirculation as a novel marker of membrane biocompatibility. *Int. J. Artif. Organs*, 2006, 29, p. 1117–1120.
27. **Sato, M. et al.** Effect of different dialyzer membranes on cutaneous microcirculation during hemodialysis. *Clin. Nephrol.*, 2006, 66, p. 426–432.

Studie byla vypracována s podporou v rámci hlavního výzkumného záměru č. MSM 0021620819 Náhrada a podpora funkce některých životně důležitých orgánů.

Poděkování: Děkuje L. Trefilovi, L. Vítovi a L. Reifové za technickou pomoc a firmě Biomedica CS za laskavé zapůjčení přístroje LYNDA.

Došlo dne 16. 11. 2009.

Přijato dne 4. 1. 2010.

Adresa pro korespondenci:
Prof. MUDr. Martin Matějovič, Ph.D.
I. interní klinika FN Plzeň
Alej Svobody 80
304 60 Plzeň
e-mail: matejovic@fnplzen.cz